L'analyse des nombres donnés par la Tab. 1 montre que l'orientation dans le retour au gîte est, sur notre terrain d'expérience, influencée par un effet directionnel qui facilite les retours vers le sud et rend difficiles ceux vers le nord. L'orientation vers l'est ou l'ouest n'est que moyennement perturbée par cet effet.

L'exposé détaillé des résultats paraîtra dans la *Zeitschrift für Tierpsychologie.*

TABELLE 1.

Retour au gîte des Mulots.

Déplacement subi	*m* Mulots déplacés	*n* Mulots rentrés	*m/n* (%)
N ⟶ S	28	0	0
W ⟶ E	18	2	11
S ⟶ N	22	7	32
E ⟶ W	34	6	18

N° 14. **P. S. Chen,** Zürich. Trennung der freien Aminosäuren und Peptide von Seeigeleiern mittels Ionenaustauschchromatographie.[1] (Mit 1 Textabbildung und 3 Tabellen.)

Zoologisch-vergl. anatomisches Institut der Universität Zürich.

Herrn Prof. Dr. E. Hadorn zum 60. Geburtstag gewidmet.

Frühere Untersuchungen am Proteinstoffwechsel der Seeigelkeime zeigten, dass das Muster der freien Aminosäuren und Peptide artspezifisch ist (CHEN und BALTZER 1958, BALTZER, CHEN und WHITELEY 1958). Die Eier von *Paracentrotus lividus* sind besonders

[1] Ausgeführt mit Unterstützung durch die Georges und Antoine Claraz-Schenkung und den Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung. Herrn Prof. Dr. H. K. MITCHELL bin ich für seine Einfuhrung in die Technik der Säulenchromatographie und seine wertvollen Ratschläge zu herzlichem Dank verpflichtet.

reich an Glycin. Bei *Arbacia lixula* tritt eine ganz andere konzentrierte Ninhydrin-positive Substanz auf, deren Rf-Werte denjenigen von Aminobuttersäure entsprechen. *Sphaerechinus granularis* unterscheidet sich von den beiden Arten durch das Vorkommen eines Tripeptids. Weitere artspezifische Unterschiede wurden bei *Genocidaris maculata*, *Psammechinus microtuberculatus* und *Echinocardium cordatum* festgestellt (siehe Chen 1958). Bei allen diesen Untersuchungen wurde ausschliesslich die Technik der Papierchromatographie verwendet. Diese Methode ist empfindlich, relativ einfach durchzuführen, und besonders geeignet, ein Uebersichtsbild des zu untersuchenden Materials zu gewinnen. Ihr Auflösungsvermögen ist aber durch die Kapazität des Papiers stark beschränkt; bei Verwendung grösserer Probemengen wird die Trennung der Substanzen auf dem Chromatogramm unscharf. Das papierchromatographische Verfahren erfasst deshalb nur diejenigen Stoffe, die im Extrakt in relativ hoher Konzentration vorhanden sind. Bei Seeigeleiern, bei welchen das Verhältnis der Stoffverteilung stark verschieden ist, wird die Auftrennung besonders schwierig. In dieser Hinsicht erweist sich die Ionenaustauschchromatographie als vorteilhafter; sie erlaubt bei jeder Bestimmung eine viel grössere Substanzmenge zu verwenden und trotzdem eine gute Aufteilung der einzelnen Stoffe zu erzielen.

Im Rahmen unserer Untersuchungen über die Entwicklungsphysiologie und Biochemie der Seeigelbastarde wurden in der vorliegenden Arbeit die freien Aminosäuren und Peptide in den unbefruchteten Eiern von drei verschiedenen Seeigelarten nach einem von Mitchell und Simmons (1962) ausgearbeiteten Gradient-Puffersystem mittels einer Kunstharzsäule fraktioniert. Anschliessend wurden die Substanzen in jeder Fraktion mit Hilfe der Säurehydrolyse, ein- und zweidimensionaler Papierchromatographie identifiziert. Unser Ziel besteht darin, das artspezifische Stoffinventar der Seeigeleier so genau wie möglich aufzunehmen. Ausser den freien Aminosäuren interessieren uns vor allem die Peptide, welche bekanntlich eine zentrale Stelle in der Eiweissynthese einnehmen. Da unsere Untersuchungen noch im Gang sind, handelt es sich hier nur um eine vorläufige Feststellung. Die ausführliche Beschreibung der Technik sowie die quantitative Auswertung der Untersuchungsergebnisse sollen in einer späteren Publikation veröffentlicht werden.

Material und methode

Unbefruchtete reife Eier von *Paracentrotus lividus*, *Arbacia lixula* und *Sphaerechinus granularis* wurden in der Zoologischen Station in Neapel gesammelt und lyophilisiert. Die Verarbeitung des lyophilisierten Materials wurde in unserem Institut in Zürich durchgeführt.

Für die Extraktion der freien Ninhydrin-positiven Stoffe wurde 1 g. der bei tiefer Temperatur getrockneten Eisubstanz zuerst in einem Bühler-Homogenisator in 30 ml gekühltem Methanol während 15 Minuten homogenisiert. Während der Homogenisierung wurde das Glasgefäss mit einem Trockeneis-Methylglycol-Gemisch abgekühlt. Das Filtrieren erfolgte in einem Glasfilter-Trichter bei —27° C. Anschliessend wurde der Rückstand noch zweimal mit je 30 ml 50% igem Methanol gewaschen. Das Filtrat wurde in einem Vakuum-Rotationsverdampfer bei 26° C eingedickt. Um die fetthaltigen Substanzen zu entfernen, wurde das eingedickte Material in 10 ml destilliertem Wasser aufgelöst, und mit dem gleichen Volumen Chloroform in einem Scheidertrichter geschüttelt. Vor der Einführung in die Harzsäule wurde dem fettfreien Extrakt noch 10 ml Pufferlösung von pH 2,5 zugegeben. Ueber die weitere Verarbeitung des Rückstands im Glasfilter-Trichter werden wir in einer späteren Publikation noch berichten.

Für die Fraktionierung der Aminosäuren und Peptide benützten wir das Kunstharz Dowex 50, das mit 1 M NaOH und HCl vorbehandelt wurde. Die Grösse der Säule betrug 1,0 × 40 cm. Das Gradient-Puffersystem bestand aus Ammoniumformiat und Ammoniumazetat, und variierte zwischen pH 2,5 bis 8,0. Tabelle 1 gibt eine Uebersicht über Reihenfolge, Konzentration, Menge und pH-Werte der gebrauchten Pufferlösungen. Das Eluat aus der Kunstharzsäule wurde mittels eines automatischen Sammlers in über 200 Fraktionen aufgeteilt, und jede Fraktion enthielt 5 ml Flüssigkeit.

Sämtliche Fraktionen wurden lyophilisiert, und die eingedickten Substanzen in den Tuben wiederum je in 0,2 ml destilliertem Wasser aufgenommen. Darauf pipettierten wir aus jedem Tubus 0,02 ml Lösung in eine Ampulle für die Hydrolyse (6 N HCl, 12 Stunden bei 110° C). Je nach der Substanzmenge wurde 1 bzw. 5 μl des Eluats des Hydrolysates der gleichen Fraktion neben-

einander auf das Filterpapier gebracht und eindimensional chromatographiert. Wenn die Fraktion mehrere Substanzen enthielt, verwendeten wir zusätzlich das zweidimensionale Verfahren für die weitere Stoffauftrennung (für die papierchromatographische

Tabelle 1.

Uebersicht des Gradient-Puffersystems für die Fraktionierung der Aminosäuren und Peptide.

Reihenfolge	Pufferlösung	pH	Konzentration	Volumen der gebrauchten Pufferlösung
1	Ammoniumformiat	2,50	0,05 M	106 ml
2	Ammoniumformiat	2,90	0,10	159
3	Ammoniumformiat	3,30	0,15	159
4	Ammoniumformiat	3,65	0,20	159
5	Ammoniumazetat	5,50	0,40	212
6	Ammoniumazetat	6,80	0,60	159
7	Ammoniumazetat	8,00	1,00	159

Technik siehe Hadorn und Stumm-Zollinger 1953, Chen und Hadorn 1954). Um das Ammoniumformiat auf dem Papier zu entfernen, wurden die eindimensionalen Chromatogramme zunächst bei 60° C während 20 Minuten erhitzt. Diese wurden dann mit einer 0,5%igen Lösung von Ninhydrin in absolutem Aceton behandelt, und während 30 Minuten bei 60° C gehalten. Die quantitative Auswertung der Farbintensität erfolgte durch Messung des Papierstreifens mit dem Analytrol (Spinco-Modell RB).

Ergebnisse und Diskussion

Um die Auflösungsfähigkeit des von uns angewandten Gradient-Puffersystems zu prüfen, haben wir in einem Vorversuch 0,8-1,5 mg verschiedene reine Aminosäuren in die Harzsäule eingeführt, und nach dem oben beschriebenen Verfahren fraktioniert. Wie aus Abbildung 1 ersichtlich ist, werden sämtliche 17 Aminosäuren gut aufgetrennt. Das Taurin kommt sehr früh aus der Säule, und dann folgen die sauren und neutralen Aminosäuren. Die basischen Aminosäuren, wie Lysin, Histidin und Arginin, erscheinen erst zwischen der 144. und 190. Fraktion. Auch stimmt die Reihenfolge aller Aminosäuren im Eluat mit dem Befund von Mitchell und Simmons (1962) gut überein.

Die Untersuchungen der drei Seeigelarten ergaben, dass sie alle Leucin, Isoleucin und Phenylalanin enthalten. In einer früheren Arbeit konnten wir dies nicht mit Sicherheit feststellen, weil mit dem von uns gebrauchten papierchromatographischen System die Trennung dieser drei Aminosäuren nicht möglich war (siehe Chen und Baltzer 1958). Ferner bestätigte die vorliegende Arbeit

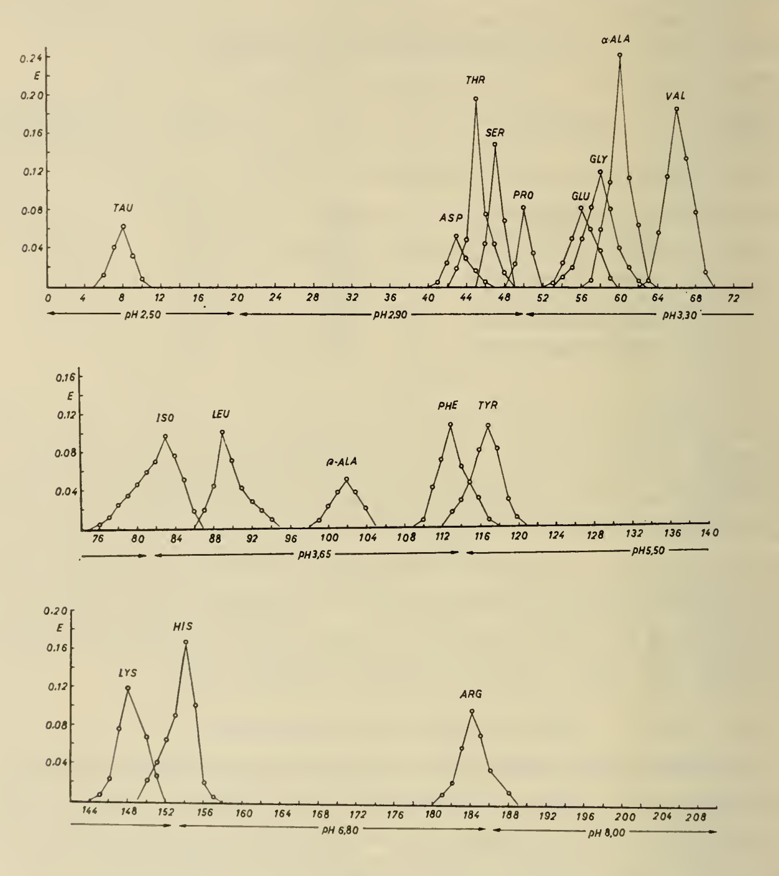


Abb. 1.

Trennung eines künstlichen Aminosäuregemisches an einer Säule von Dowex 50. Säule 1,0 × 40 cm. Angewandt 0,8-1,5 mg pro Aminosäure. Ordinate: Extinktionswerte (E); Abszisse: Reihenfolge der Fraktionen.

unsere früheren Befunde, wonach die Eier von *P. lividus* und *S. granularis* aussergewöhnlich reich an Glycin sind. Bei *A. lixula* wurde die von Chen und Baltzer als « Fast-Aminobuttersäure »

genannte Ninhydrin-positive Substanz in den Fraktionen 48-64 nachgewiesen. Diese Tatsache deutet darauf hin, dass dieser Stoff, in Uebereinstimmung mit unserer früheren Vermutung, eine saure Aminosäure sein muss. Da wir jetzt eine grössere Menge des vorliegenden Stoffes zur Verfügung haben, wird eine genaue Identifizierung erleichtert. Weitere Untersuchungen, wie die Reinigung durch Elektrophorese und die Aufnahme des Absorptionsspektrums, sind im Gang. Gestützt auf die früheren Ergebnisse der papierchromatographischen Untersuchungen von CHEN und BALTZER (1958) und diejenigen der vorliegenden Arbeit, sind in Tabelle 2 die gefundenen freien Aminosäuren dieser drei Seeigelarten zusammengefasst.

TABELLE 2.

Freie Aminosäuren in Methanolextrakten der unbefruchteten Eier der drei Seeigelarten.

Aminosäure	*Paracentrotus lividus*	*Arbacia lixula*	*Sphaerechinus granularis*
α-Alanin	+	+	+
β-Alanin	+	—	—
Arginin	+	+	+
Asparagin	+	+	+
Asparaginsäure	+	+	+
Cystein	—	—	+
Cystin	+	+	+
Glutaminsäure	+	+	+
Glutamin	+	+	+
Glycin	+	+	+
Histidin	+	+	+
Isoleucin	+	+	+
Leucin	+	+	+
Lysin	+	+	+
Methionin	+	—	—
Ornithin	+	+	—
Phenylalanin	+	+	+
Prolin	+	+	+
Serin	+	+	+
Threonin	+	+	+
Tyrosin	—	+	+
Valin	+	+	+
„Fast-Aminobuttersäure"	—	+	—
Unbekannt	+	+	+

Wie bereits erwähnt, sind die Eier von *S. granularis* durch das Vorkommen eines Tripeptids gekennzeichnet. Aus der Analyse sämtlicher Fraktionen der vorliegenden Art ergab sich, dass dieses

Peptid zwischen der 94. und 101. Fraktion eluiert werden konnte. In Uebereinstimmung mit unserem früheren Befund zeigte die Säurehydrolyse, dass es aus Asparaginsäure, Glutaminsäure und Alanin besteht.

TABELLE 3.

Charakterisierung einiger Peptide, die in Eiextrakten in relativ hoher Konzentration vorkommen.

Art	Peptid	Fraktion	Aminosäurezusammensetzung *
Paracentrotus lividus	P 17 *a,b*	21-30	Asp,Glu,Gly
	P 22	59-71	Asp,Glu,Gly
	P 26 *a,b*	110-117	Asp,Glu,Gly,Ser
	P 27	118-120	Asp,Glu,Gly
	P 28	121-124	Asp,Glu,Gly
	P 29 *a,b*	125-131	Asp,Gly
	P 30	132-133	Asp,Glu,Gly,Ala
	P 32 *a,b,c*	136-141	Asp,Glu,Gly,Val,Leu
	P 33	142-153	Asp,Glu,Gly
Arbacia lixula	P 1 *a,b*	5-15	Asp,Glu,Ala
	P 4 *a,b,c,d*	14-16	Glu,Gly,Ala
	P 7	69-79	Asp,Glu
	P 8	80-89	Asp,Glu,Gly,Ala
	P 9-11	90-94	Asp,Glu,Gly,Ala,Cys
	P 12 *a,b,c*	91-99	Glu,Ala
	P 15	108-110	Asp,Glu,Gly,Ala,Val,Leu
	P 17 *a,b*	122-127	Asp,Gly
	P 18-19	128-132	Asp,Glu,Gly,Ala,Val,Leu,Ser
Sphaerechinus granularis	P 2-4	7-13	Asp,Glu,Gly
	P 5	9-20	Asp,Glu,Gly
	P 6	21-30	Glu,Gly
	P 8	34-45	Asp,Glu,Gly
	P 9-10	81-83	Asp,Glu,Gly
	P 15-16	90-94	Asp,Glu,Gly,Ala,Val
	P 17	92-96	Asp,Glu,Gly,Ala
	P 18	94-101	Asp,Glu,Ala
	P 25	126-138	Asp,Glu,Gly,Ser,Val,Leu

* Die Zusammensetzung bedeutet nur die in Hydrolysaten gefundenen Aminosäuren, d.h. nicht die Sequenz und auch nicht die Frequenzen der Aminosäuren in den Peptidketten.

Was die übrigen Peptide anbelangt, können die neuen Ergebnisse wie folgt zusammengefasst werden: bei *S. granularis* und *A. lixula* kamen bereits zwischen der 5. und 15. Fraktion grosse Mengen von Peptiden aus der Säule. Bei *P. lividus* wurden ebenfalls verschiedene Peptide nachgewiesen, die vor der Asparaginsäure erschei-

nen; sie waren aber stets schwach konzentriert. Die „stärksten" Peptide fanden wir bei dieser Art erst zwischen der 136. und 141. Fraktion. Die eingehende Analyse sämtlicher Fraktionen zeigt, dass die von uns untersuchten Eiextrakte dieser drei Seeigelarten mindestens 30-40 verschiedene Peptide enthalten. Tabelle 3 gibt eine Uebersicht über die Reihenfolge und die Aminosäurezusammensetzung derjenigen Peptide, die im Eluat in grösseren Mengen vorhanden sind.

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Untersuchung, dass man mit dem von uns angewandten Gradient-Puffersystem der Ionenaustauschchromatographie ein charakteristisches Spektrum der freien Ninhydrin-positiven Substanzen für jede der drei Seeigelarten gewinnen kann. Aminosäuren, die sich auf den zweidimensionalen Papierchromatogrammen häufig überlappen, können deutlich aufgetrennt werden. Insbesondere die Peptide, die meistens schwach konzentriert sind und mit der Papierchromatographie nicht erfasst werden, treten in bestimmter Reihenfolge in den Fraktionen auf. Da die hier aufgeteilten Fraktionen meist mehr als eine Substanz enthalten, versuchen wir nun, durch geeignete Wahl der Pufferlösungen das Auflösungsvermögen der Fraktionierungstechnik noch zu verbessern.

Summary

1. The present paper is a preliminary report on the fractionation of free amino acids and peptides in the unfertilized eggs of three sea urchin species *(Paracentrotus lividus*, *Arbacia lixula* and *Sphaerechinus granularis)* by means of column chromatography. The technique used in this study was based on that described by Mitchell and Simmons (1962) using Dowex 50 in the column and ammonium formate and ammonium acetate in the gradient buffer system.

2. In addition to other amino acids previously reported by Chen and Baltzer (1958), it was found that eggs of all these three sea urchin species contain isoleucine, leucine and phenylalanine. In agreement with our earlier findings the eggs of *P. lividus* and *S. granularis* are especially rich in glycine, while those of *A. lixula* are characterized by the occurence of another concentrated ninhydrin-positive substance, probably an aminobutyric acid.

3. The three sea urchin species also differ distinctly in their patterns of peptides. In *S. granularis* and *A. lixula* large amounts of peptides could be eluted from the column between fractions 5-15, whereas in *P. lividus* the concentration of peptides in these early fractions was very low. At least 30-40 different peptides could be detected in all fractions of the three species investigated. Our work to purify these peptides and to identify their amino acid compositions is still in progress.

LITERATURVERZEICHNIS

Baltzer, F., P. S. Chen and A. H. Whiteley. 1958. *Biochemical studies on sea urchin hybrids.* Exptl. Cell Research, Suppl. 6: 192.

Chen, P. S. 1958. *Further studies on free amino acids and peptides in eggs and embryos of different sea urchin species and hybrids.* Experientia 14: 369.

— and F. Baltzer. 1958. *Species-specific differences in free amino acids and peptides in sea urchin eggs and embryos (pure species and hybrids).* Nature 181: 98.

— und E. Hadorn. 1954. *Vergleichende Untersuchungen über die freien Aminosäuren in der larvalen Hämolymphe von Drosophila, Ephestia und Corethra.* Rev. suisse Zool. 61: 437.

Hadorn, E. und E. Stumm-Zollinger. 1953. *Untersuchungen zur biochemischen Auswirkung der Mutation « letal-translucida » (ltr) von Drosophila melanogaster.* Rev. suisse Zool. 60: 506.

Mitchell, H. K. and J. R. Simmons. 1962. *Amino acids and derivatives in Drosophila.* In: *Conference on Free Amino Acid Pools* (im Druck).